

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

**2 797 784**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

**99 10854**

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : B 01 J 13/02, B 01 J 13/06, B 01 F 17/56, 17/38 //  
A 61 K 9/50

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②2 Date de dépôt : 27.08.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 02.03.01 Bulletin 01/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : MAINELAB Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BENOIT JEAN PIERRE, RICHARD  
JOEL, FOURNIER ELVIRE et LIU SONIA.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 PROCÉDE D'ENCAPSULATION DE MATIERES ACTIVES PAR COACERVATION DE POLYMERES EN  
SOLVANT ORGANIQUE NON-CHLORE.

⑤7 La présente invention concerne un procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation qui consiste en la désolvatation ménagée ou coacervation d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant ledit principe actif, ladite coacervation étant induite par addition d'un non-solvant et se traduisant par le dépôt du polymère à la surface du principe actif, et en le durcissement du dépôt de polymère par ajout d'un agent durcisseur, ledit durcissement se traduisant par la formation d'un film continu enrobant le principe actif, caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi l'acétate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone, la méthyléthylcétone et l'acide acétique.

Le non-solvant est avantageusement un alcool comprenant deux à 5 atomes de carbone et l'agent durcisseur est par exemple choisi parmi l'eau, les alcools comprenant un à 4 atomes de carbone et leurs mélanges.

FR 2 797 784 - A1



La présente invention concerne un procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation, utilisé notamment pour préparer des formes galéniques à libération prolongée.

Les techniques de microencapsulation sont classiquement utilisées pour séparer des substances chimiques incompatibles, convertir des liquides en poudres, améliorer la biodisponibilité de principes actifs, masquer le goût ou l'odeur désagréable de certains composés et préparer des formes galéniques à libération prolongée.

Les formes galéniques à libération prolongée sont susceptibles d'être administrées par voie sous-cutanée ou intramusculaire, et de se retrouver directement dans le flux sanguin ou à proximité de l'organe à traiter si bien que les polymères biodégradables sont souvent choisis pour entrer dans leur composition.

Les systèmes à libération prolongée à base de polymères biodégradables peuvent être administrés par la voie parentérale, sans retrait par intervention chirurgicale, puisque les polymères biodégradables se transforment dans l'organisme en métabolites éliminés par les voies naturelles. Le principe actif est libéré, suivant une cinétique modulée par la diffusion du principe actif et le processus de dégradation du polymère. De plus, l'observance du patient est améliorée du fait d'une administration moins fréquente.

Parmi les polymères biodégradables d'emploi fréquent dans l'encapsulation de principes actifs figurent les poly( $\alpha$ -hydroxy-acides), notamment les polymères d'acide lactique (PLA) et les polymères d'acides lactique et glycolique (PLAGA), la poly- $\epsilon$ -caprolactone, les polyorthoesters comme Chronomer® et Alzamer®, les polyanhydrides, notamment le copolymère d'acide sébacique et de (carboxyphénoxy)propane, les polypeptides et les polymères naturels biodégradables, comme l'albumine, la sérum albumine bovine, le collagène et le chitosane.

Il existe deux grands types de techniques de microencapsulation :

- les techniques sans solvant, comme le spray-congealing, l'extrusion (coextrusion/sphéronisation), la gélification, le prilling et la précipitation de solutions supercritiques (RESS), et
- les techniques avec solvants, comme la nébulisation, la coacervation, l'émulsion-évaporation, l'émulsion-extraction, avec leurs variantes à partir d'émulsions doubles eau/huile/eau.

Le contact prolongé des formes galéniques à libération prolongée avec un milieu aqueux justifie l'emploi de polymères à caractère plus ou moins hydrophobe, donc principalement solubles dans un milieu  
10 organique. Les polymères biodégradables à la base de systèmes à libération contrôlée sont cependant faiblement solubles dans les solvants de faible toxicité potentielle (solvants de classe 3 selon la norme ICH).

C'est pourquoi, les techniques classiques de microencapsulation (coacervation, émulsion-évaporation) emploient essentiellement des  
15 solvants chlorés comme le dichlorométhane (solvant de classe 2 selon la norme ICH, i.e. solvant à limiter) comme solvant du polymère. Or c'est un solvant chloré connu pour sa neurotoxicité. Le taux résiduel de dichlorométhane autorisé dans le produit fini est de 600 ppm selon la norme ICH4.

20 Quelle que soit la technique de microencapsulation employée, les microparticules obtenues renferment des quantités de solvants résiduelles. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes de microencapsulation ne faisant pas appel aux solvants chlorés. Deux solutions majeures se présentent pour résoudre ce  
25 problème.

Une solution permettant de réaliser l'encapsulation sans solvants chlorés repose sur des méthodes ne mettant en œuvre aucun solvant, mais certains polymères ne peuvent pas être mis en œuvre selon ces méthodes. En outre, les propriétés des particules obtenues par ces  
30 méthodes ne correspondent pas forcément aux exigences d'un traitement à long terme.

Une autre solution consiste à substituer les solvants chlorés par des solvants non toxiques. Les méthodes de microencapsulation qui utilisent des solvants chlorés ont été largement étudiées et les facteurs de variation sont connus. Cependant, la substitution des solvants chlorés par des solvants non chlorés modifie les interactions physico-chimiques entre les différents composants de la formulation. Le comportement des polymères biodégradables dans les solvants de substitution est très différent de celui dans les solvants chlorés. Ainsi, le poly(L-lactide) et le poly(D,L-lactide) sont insolubles dans l'acétate d'éthyle ou l'acétone et aucun polymère n'est soluble dans l'alcool éthylique, qui est pourtant un solvant de prédilection puisqu'il est faiblement toxique.

La présente invention propose un procédé de microencapsulation par coacervation qui n'utilise aucun solvant chloré. Plus précisément l'invention concerne un procédé de coacervation par ajout de non-solvant.

La coacervation par ajout de non-solvant requiert l'usage de trois solvants miscibles ; un de ces trois solvants est solvant du polymère et les deux autres sont non-solvants du polymère.

Le principe de la coacervation repose sur la désolvatation ménagée d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant un principe actif généralement sous forme particulaire, induit par addition d'un non-solvant ou agent de coacervation du polymère. La solubilité du polymère dans le solvant organique est abaissée et il se forme deux phases non miscibles ; le coacervat se dépose progressivement à la surface du principe actif. L'ajout d'un durcisseur permet la formation d'un film continu de polymère autour du principe actif.

Les particules de principe actif peuvent être liquides ou solides. Le principe actif peut également être initialement dissous dans le solvant du polymère. Il reprécipite alors sous forme particulaire lorsque l'on ajoute l'agent de coacervation, ou peut former une solution solide homogène dans les particules de polymère issues de la coacervation.

L'étude des interactions polymère/solvant/agent de coacervation, pour chaque association, permet de réaliser un diagramme de phases de

façon à définir le rapport idéal polymère/solvant/agent de coacervation nécessaire à une encapsulation efficace. Cependant, il est difficile de prédire l'encapsulation d'un principe actif, car les propriétés interfaciales, en rapport avec les interactions moléculaires entre le polymère, le solvant et l'agent de coacervation, changent constamment avec la composition du coacervat (Thomassin C., Merkle H.P., Gander B.A., Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyester by coacervation, Int. J. Pharm., 1997, 147, 173-186).

Le problème majeur de la technique de coacervation est l'agglomération possible de particules. Pour tenter de le résoudre, des auteurs ont proposé de réduire la température du système, essentiellement à l'étape de durcissement. Les parois sont alors suffisamment solides pour éviter l'adhésion. Des solutions telles que l'emploi de chloro-fluoro-carbones (CFC) ou l'abaissement de la température ne sont pas transposables à l'échelle industrielle. En revanche, l'emploi d'huile de silicone est capable de stabiliser le système grâce à sa viscosité (Ruiz J.M., Tissier B., Benoit J.P., Microencapsulation of peptide: a study of the phase separation of poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) copolymers 50/50 by silicone oil, Int. J. Pharm., 1989, 49, 69-77).

La technique de coacervation, malgré des taux élevés de solvants résiduels reste une technique de choix pour l'encapsulation de principes actifs fragiles, et surtout de principes actifs hydrosolubles, en milieu non aqueux.

Le choix des associations solvant/agent de coacervation/durcisseur est guidé par divers critères :

- le solvant doit solubiliser le polymère ; on préfère qu'il ne solubilise pas le principe actif, bien que le procédé reste toujours utilisable avec un principe actif soluble dans le solvant du polymère.
- l'agent de coacervation doit être miscible au solvant du polymère. Il ne doit pas être solvant du polymère, car sinon cela reviendrait à un simple transfert du polymère du solvant vers l'agent de coacervation.

De plus, il ne doit pas solubiliser le principe actif pour limiter les pertes d'encapsulation.

- le durcisseur doit être partiellement miscible au solvant du polymère pour en faciliter l'extraction. Il ne doit solubiliser, ni le polymère, ni le principe actif, car sinon le rendement d'encapsulation serait fortement diminué.

Dans l'art antérieur, la technique de coacervation fait appel au dichlorométhane ou au chloroforme comme solvant du polymère, à une huile silicone comme agent de coacervation, et à l'heptane comme durcisseur.

La présente invention concerne un procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation qui consiste en

la désolvatation ménagée ou coacervation d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant ledit principe actif, ladite coacervation étant induite par addition d'un non-solvant et se traduisant par le dépôt du polymère à la surface dudit principe actif, puis

- le durcissement du dépôt de polymère par ajout d'un agent durcisseur, ledit durcissement se traduisant par la formation d'un film continu enrobant ledit principe actif,

caractérisé en ce que

- le solvant du polymère est un solvant organique non chloré de point d'ébullition compris entre 30°C et 240 °C et de permittivité diélectrique relative et comprise entre 4 et 60, avantageusement choisi parmi l'acétate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone, la méthyléthylcétone, l'acide acétique, le propylène carbonate et leurs mélanges,

- le non-solvant est un alcool ou une cétone comprenant 2 à 5 atomes, et préférentiellement 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier l'éthanol ( $\epsilon=24$ ), le propan-2-ol ( $\epsilon=18$ ), le propane-1,2-diol ( $\epsilon$  entre 18 et 24) et le glycérol ( $\epsilon=40$ ), ou la méthyléthylcétone ( $\epsilon=18$ ).

l'agent durcisseur est choisi parmi l'eau, les alcools comprenant 1 à 4 atomes de carbone à condition que l'agent durcisseur soit un alcool différent du non-solvant, et leurs mélanges.

Bien que la N-méthylpyrrolidone soit de classe 2 comme le dichlorométhane, sa concentration limite est nettement plus élevée (4840 ppm contre 600 ppm pour le dichlorométhane).

De façon avantageuse, le non-solvant et le durcisseur sont respectivement choisis parmi les couples suivants : propane-1,2-diol et propan-2-ol, glycérol et propane-1,2-diol, glycérol et propan-2-ol, propan-2-ol et propane-1,2-diol.

Selon un mode de réalisation préféré, le polymère est un polymère biodégradable dont la masse moléculaire en poids (Mw) est comprise entre 10 000 et 90 000 g/mole, de préférence entre 15 000 et 50 000 g/mole, dont l'indice de polydispersité (Ip) est comprise entre 1 et 3,5, de préférence entre 1,5 et 2,5.

On indiquera ci-après un certain nombre d'autres caractéristiques additionnelles pour illustrer divers modes de mises en œuvre préférentielles de l'invention.

Selon ces caractéristiques additionnelles, le polymère est un polymère d'acide lactique (PLA) ou un copolymère d'acides lactique et glycolique (PLAGA).

Le polymère est un PLAGA tel que Mw est comprise entre 15 000 et 20 000 g/mole, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6, et le pourcentage d'acide glycolique est inférieur à 30%, de préférence égal à 25%.

La concentration en polymère dans le solvant est comprise entre 1 et 10% (p/v), de préférence de l'ordre de 4% (p/v).

Le rapport volumique non-solvant/solvant est compris entre 1/2 et 1/1.

La température de coacervation est inférieure à la température de transition vitreuse du polymère, de préférence inférieure ou égale à 25°C,

de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure ou égale à -4°C.

Le non-solvant est ajouté par doses successives de 200 µl à 1 ml.

La coacervation est réalisée sous agitation, par exemple sous agitation magnétique, à une vitesse comprise entre 200 et 1000 t/min.

L'agent durcisseur contient en outre un agent tensioactif, la concentration dudit agent tensioactif dans l'agent durcisseur étant comprise entre 0,5 et 10% (v/v).

L'agent tensioactif est un ester de sorbitan, par exemple le Tween<sup>®</sup> 80, ou l'alcool polyvinylique.

Le rapport volumique agent durcisseur/solvant est compris entre 5/1 et 180/1, et de préférence entre 15/1 et 120/1.

Le durcissement des microsphères est réalisé sous agitation, par exemple magnétique à une vitesse comprise entre 500 et 1500 t/min.

La température de durcissement est inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure ou égale à 0,5°C.

Le durcisseur est ajouté en plusieurs fois, de préférence en quatre fois au minimum.

Le durcissement dure entre 2 et 4 heures.

Les microparticules obtenues à la suite du durcissement sont filtrées sur système Millipore<sup>®</sup>, par centrifugation ou sur papier plissé.

Lorsque le principe actif forme une dispersion dans la solution de polymère, le solvant et le non-solvant ont une viscosité suffisamment élevée pour stabiliser le principe actif.

La granulométrie du principe actif est comprise entre 1 et 50 microns, et préférentiellement entre 5 µm et 30 µm.

Selon un mode de réalisation préféré, le solvant est la N-méthylpyrrolidone, le non-solvant est l'éthanol, et le durcisseur est l'eau.

Selon un autre mode de réalisation préféré, le solvant est l'acétate d'éthyle, le non-solvant est le propan-2-ol, et le durcisseur est l'eau. Le



polymère est un PLAGA 75:25 tel que Mw est comprise entre 15 000 et 20 000, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6.

Selon un troisième mode préféré de réalisation, le solvant est l'acide acétique, le durcisseur est l'eau, et le polymère est un PLAGA 50:50.

Dans le cadre de la présente invention, lorsque le principe actif est insoluble dans le solvant du polymère, on réalise soit une suspension, soit une émulsion.

Pour préparer la suspension, le principe actif est broyé au mortier puis mis en suspension dans le solvant. La suspension peut être homogénéisée sous agitation magnétique, la coacervation est alors aussi réalisée sous agitation magnétique. La suspension peut également être homogénéisée sous agitation mécanique, à vitesse variable (agitateur à hélice, Heidolph RGL500, Prolabo, Paris, France) ou à l'aide d'un Ultra-Turrax® T25 (Prolabo, Paris, France). Dans ces deux derniers cas, la coacervation est alors réalisée sous agitation mécanique.

La dispersion du principe actif dans la solution de polymère peut également être classiquement réalisée sous agitation par ultrasons.

Lorsque le principe actif est hydrosoluble, pour préparer l'émulsion, le principe actif est dissous dans l'eau, puis une émulsion eau/solvant du polymère est réalisée sous agitation mécanique. La coacervation se fait ensuite sous agitation mécanique.

Lorsque le principe actif est soluble dans le solvant du polymère, la coacervation est réalisée sous agitation mécanique.

Dans le cadre de la présente invention, le polymère est un polymère biodégradable d'emploi fréquent dans l'encapsulation de principes actifs, de préférence un PLA ou un PLAGA, de préférence encore un PLAGA, de masse molaire en poids (Mw) comprise entre 10 000 et 90 000, de masse molaire en nombre (Mn) comprise entre 4 000 et 40 000, d'indice de polydispersité (Ip) compris entre 1 et 3,5, et dont la proportion de glycolide est comprise entre 10 et 60 %. On préférera les

polymères de masse molaire en poids élevée supérieure ou égale à 15000 g/mole car ils permettent d'augmenter le rendement de fabrication en augmentant le volume de la phase de coacervat. On préférera également les polymères dont l'indice de polydispersité est faible ( $I_p \leq 2,6$ ), car les fractions de bas poids moléculaire restent en solution et entraînent une baisse de rendement, ou provoquent l'agglomération des microparticules en se collant à leur surface.

Le PLAGA est par exemple le Resomer® RG 502 (Boehringer Ingelheim;  $M_w=14\ 300$  g/mole;  $M_n=6\ 900$  g/mole,  $I_p=2,5$ , 50 % de glycolide), le Resomer® RG 756 ( $M_w=89\ 800$  g/mole,  $M_n=35\ 200$  g/mole,  $I_p=2,6$ , 25 % de glycolide), le Resomer® RG 858 ( $M_w=87\ 000$  g/mole,  $M_n=22\ 000$  g/mole,  $I_p=3,9$ , 15 % de glycolide), le Phusiline fourni par Phusis ( $M_w=17\ 500$  g/mole,  $M_n=10\ 940$  g/mole,  $I_p=1,6$ , 25 % de glycolide).

La concentration en polymère dans le solvant doit être suffisante pour augmenter la viscosité du milieu, ce qui permet de stabiliser les gouttelettes de coacervat dispersées et de limiter leur agrégation, d'une part, et de diminuer la formation de microparticules de petite taille, d'autre part.

La concentration en polymère est de préférence comprise entre 1 et 10 % (p/v), de préférence encore égale à environ 4 % (p/v).

Les viscosités du solvant et du non-solvant doivent être suffisantes pour stabiliser les gouttelettes de coacervat.

Le volume de non-solvant à ajouter est défini de manière à porter le système dans la fenêtre de stabilité et obtenir un coacervat stable. Cependant, le volume de non-solvant dépend également de la concentration des cristaux de principe actif en suspension dans la solution organique de polymère.

L'addition d'un excès de non-solvant permet d'accélérer le durcissement de la paroi des microparticules, de prévenir leur agglomération et d'améliorer l'extraction du solvant.

La vitesse d'addition du non-solvant est suffisamment basse pour éviter la formation d'un grand nombre de microparticules trop petites, i.e. de taille comprise entre 1 et 2  $\mu\text{m}$ . En outre, plus la séparation de phase est lente, plus la distribution granulométrique des microparticules est uniforme et plus la surface des microparticules est lisse. L'ajout de non-solvant se fait de préférence graduellement par doses de 200  $\mu\text{l}$  à 1 ml, en observant au moins une minute entre chaque dose.

Une diminution de la vitesse d'agitation pendant l'étape de coacervation augmente la taille des gouttelettes de coacervat puis des microparticules finales. Mais en dessous d'une vitesse limite, variable en fonction des systèmes, la cinétique de dépôt du coacervat est trop lente et/ou les gouttelettes de coacervat sont trop grosses et ne sont pas assez stables. Une agitation mécanique ou magnétique comprise entre 200 t/min et 1000 t/min donne souvent de bons résultats.

La température est le paramètre essentiel de la coacervation ; elle doit être inférieure à la température de transition vitreuse du polymère. Plus elle est basse, plus le milieu est visqueux et moins les microparticules ont tendance à s'agréger.

Le durcisseur idéal ne doit solubiliser ni le principe actif, ni le polymère. Il doit extraire facilement le solvant du polymère. Le durcisseur employé est de l'eau éventuellement additionnée de tensioactif ou d'un alcool. L'eau permet avantageusement d'extraire facilement le solvant du polymère. Elle présente, en outre, l'avantage d'être de faible coût, de ne pas nécessiter de retraitement des effluents. Cependant, l'eau n'est pas le durcisseur idéal, dans le cas de principes actifs hydrosolubles car tout contact prolongé est responsable de la diffusion du principe actif qui se traduit par un faible taux d'encapsulation.

Lorsque le principe actif encapsulé est hydrophile, pendant le durcissement, il est rapidement dissous par l'eau qui pénètre dans les microparticules, et peut diffuser en retour hors des particules. En travaillant à basse température, on diminue les phénomènes de diffusion,

donc les fuites de principe actif vers la phase aqueuse, et on améliore le rendement d'encapsulation.

D'autres possibilités peuvent être envisagées pour réduire la diffusion du principe actif ; comme la saturation de la phase externe par un électrolyte ou le principe actif lui-même, s'il est de faible coût, et l'association de l'eau à un autre solvant, qui présente une forte affinité pour le solvant du polymère afin de l'extraire des microsphères. Ainsi, on réduit le volume d'eau employé et le contact avec l'eau est atténué.

Le tensioactif ou l'alcool permettent de limiter l'agrégation des microparticules entre elles afin de former une dispersion homogène. Ils ont été sélectionnés en fonction de leur innocuité. Les tensioactifs sont choisis parmi ceux fréquemment utilisés dans les formulations destinées à la voie injectable tels que les esters de sobitan polyoxyéthylénés, comme le Tween® 80 et le Tween® 20 (tensioactifs hydrophiles).

Le Montanox® 80 (monooléate de sorbitan polyoxyéthyléné) est un émulsifiant hydrophile, qui peut entrer dans la composition d'une émulsion de type Huile/Eau.

Le Montane® 80 (oléate de sorbitane) est son équivalent dans la gamme des tensioactifs lipophiles. Le Solutol® HS 15 (hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660) est un tensioactif non ionique, à caractère hydrophile utilisé dans les solutions injectables.

Le Synperonic® PE/F 68 (Poloxamer 188) est un copolymère-bloc de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène.

Enfin, l'alcool polyvinylique, a été employé sous deux grades différents : le Mowiol® 4/88 et le Rhodoviol® 4/125.

Le volume de durcisseur relève d'un compromis. Il doit être suffisant pour éliminer rapidement le solvant des microsphères, mais il devra limiter la diffusion du principe actif hors des microsphères. Le volume est défini d'après les critères de solubilité du solvant dans la phase externe, de manière à ce que la concentration finale du solvant dans le durcisseur soit inférieure à la concentration à saturation de la

phase externe en solvant. En éliminant rapidement le solvant, la diffusion du principe actif est empêchée par la formation d'une barrière de polymère. De plus, les microsphères seront durcies ce qui évite l'agrégation.

5 L'augmentation du volume du durcisseur, faite de façon progressive par ajouts à intervalles réguliers, permet de mieux extraire le solvant des microparticules.

Le rapport du volume du durcisseur au volume du solvant est compris entre 5/1 et 180/1, et de préférence entre 15/1 et 120/1.

10 Les associations utilisant l'acide acétique ou la N-méthylpyrrolidone comme solvant du polymère nécessitent peu d'agent durcisseur pour donner des microsphères solides, si bien que le rapport du volume du durcisseur au volume du solvant est avantageusement de l'ordre de 5/1 dans ce cas.

15 La méthode de séchage des microparticules est fonction de la rigidité des microsphères, de la taille et des volumes à traiter.

La tendance des microparticules à s'agréger après séchage dépend de leur taux d'hydratation et des quantités de solvant résiduelles.

Si un séchage à l'air libre est insuffisant, la mise sous vide et/ou  
20 l'augmentation de la température permettent de la compléter, à condition que les microparticules soient résistantes au vide. Il faut cependant s'assurer que la vitesse et la température de séchage ne soient pas trop élevées pour éviter l'agglomération des microparticules.

Dans le cas des associations utilisant l'acétate d'éthyle comme  
25 solvant du polymère, se pose le problème du choix de la méthode de séparation des microsphères. En effet, les microsphères sont encore gorgées de solvant après une agitation d'une heure dans le durcisseur. Une filtration sur un système Millipore®, à travers un filtre de porosité 0,5  $\mu\text{m}$  donne lieu à un gâteau solide difficilement redispersable. De plus, le  
30 filtre est très vite colmaté par les microsphères encore déformables. La séparation par centrifugation sur un aliquot de la solution n'a pas donné le résultat espéré. Là encore, les microsphères s'agrégent et forment un

culot, non redispersable, même à une vitesse de centrifugation peu élevée. Une autre technique de filtration utilisant un filtre en papier plissé, s'avère être une solution. Ce procédé présente l'avantage d'une surface de filtration importante et se réalise à pression atmosphérique. Cependant, les microsphères les plus petites ont tendance également à s'adsorber dans les pores et colmatent le filtre au fur et à mesure. Il est également difficile de récupérer la totalité des microsphères. Quant au séchage, il est assuré par un courant d'air comprimé, puis les microsphères sont laissées à l'air ambiant.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, le solvant du polymère est l'acétate d'éthyle, le non-solvant est le propan-2-ol, et le durcisseur est un mélange eau/tensioactif, éventuellement un mélange eau/tensioactif/alcool.

15 Dans ce mode de réalisation, le polymère est de préférence un PLAGA 75 : 25. La concentration en polymère est comprise entre 1 et 5 % (p/v), de préférence égale à environ 4 % (p/v). La coacervation est menée à température ambiante, de préférence à une température inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure à égale à - 4°C, sous agitation mécanique, de préférence à 300 t/min.

20 La concentration en tensioactif est comprise entre 1 et 10 % (v/v). Le tensioactif est le Tween® 80. Lorsqu'un alcool est associé à de l'eau, on fixe la concentration en tensioactif entre 1 et 10 % environ et la concentration en alcool entre 2,5 et 5 % environ. L'alcool est avantageusement le propan-2-ol ou le propane-1,2-diol. La solution aqueuse de durcisseur est ajoutée en au moins quatre fois. Le durcissement dure au moins 2h30 et au plus 4 heures, il est effectué à température ambiante, de préférence à une température inférieure à 4°C, de préférence encore à 0,5°C, sous agitation mécanique (500 t/min).

Le rapport volumique non-solvant /solvant est égal à 1/2.

30 Le rapport volumique durcisseur/solvant est égal à 120/1.

Plus la température de durcissement est basse, plus la durée de durcissement sera diminuée. Ainsi, lorsque la température est inférieure à

4°C, une durée de 4 heures suffit. La durée est abaissée à 2h30 quand la température est de 0,5°C.

Selon un autre mode de réalisation, le solvant est la N-méthylpyrrolidone, le non-solvant est l'éthanol et le durcisseur est un mélange eau/tensioactif. La concentration en polymère est comprise entre 4 et 10 % (p/v). La coacervation et le durcissement sont conduits à température ambiante, sous agitation magnétique. La concentration en tensioactif est comprise entre 0,5 et 10 % (v/v). La durée de durcissement est comprise entre 2 et 4 heures. Le rapport volumique durcisseur/solvant est égal à 40/1. Le polymère est de préférence le Résomer RG® 502 ou le résomer RG® 756.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants sans en limiter la portée.

**Exemple 1 : Evaluation des associations polymère/solvant/agent de coacervation/durcisseur.**

Dans cette étude, les poly( $\alpha$ -hydroxy-acides) ont été évalués. Trois copolymères d'acide lactique et glycolique, dont les proportions de L-, D-lactides et glycolides sont variables, ont été employés. Il s'agit des polymères suivants, fournis par Boehringer Ingelheim :

- le Resomer® RG 502 (Mw=14300g/mole, Mn=6900g/mole), qui comporte 25 % de L-lactide, 25 % de D-lactide et 50 % de glycolide,
- le Resomer® RG 756 (Mw=89800g/mole, Mn=35200g/mole), qui renferme 37,5 % de L-lactide, 37,5 % de D-lactide et 25 % de glycolide,
- le Resomer® RG 858 (Mw=87000 g/mole, Mn=22000 g/mole), qui possède 42,5 % de L-lactide, 42,5 % de D-lactide et 15 % de glycolide.

Au vu des solvants respectifs des polymères, les solvants les moins toxiques ont été sélectionnés. Ils appartiennent aux solvants de classe 2 ou 3, définis par la classification des lignes directrices de l'ICH.

La miscibilité des couples solvant/non-solvant des trois polymères étudiés a été ensuite déterminée. De la même manière, les non-solvants des polymères ont été choisis pour leur faible toxicité.

Le criblage des associations solvant/non-solvant/durcisseur est réalisé dans des flacons à scintillation, sur de faibles volumes de solutions organiques de polymères, à 1 ou 4 (pour la N-méthylpyrrolidone et le PLAGA 50 : 50 exclusivement) % (m/v), 5 ml de solution organique de polymère sont placés dans un flacon à scintillation. On ajoute ensuite l'agent de coacervation jusqu'à obtenir un trouble, persistant à l'agitation, qui est caractéristique de la formation de coacervat. Le coacervat est observé à cette étape en microscopie optique. Puis 1 ml de ce mélange est versé dans 10 ml d'une solution aqueuse de tensioactif. On observe par microscopie optique la présence ou non de microsphères.

#### **a) Essais de coacervation avec le PLAGA 50 : 50 (Resomer® RG 502)**

Les solvants dans lesquels le PLAGA 50 : 50 est soluble sont l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétonitrile, l'acide acétique, le diméthylacétamide, le diméthylformamide, le lactate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone et le propylène carbonate. Le PLAGA 50 : 50 est insoluble dans le toluène, le propan-2-ol, le glycérol, le dioctyladipate, le propane-1,2-diol, le xylène, le diéthylcarbonate et la méthyléthylcétone.

Les associations pour lesquelles on observe la formation d'un coacervat et de microsphères sont les suivants :

- acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + Tween® 80,
- acide acétique/propane-1,2-diol ou propan-2-ol /eau + Tween® 80,
- N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + Tween® 80 ou propan-2-ol,



- N-méthylpyrrolidone/méthyléthylcétone ou propan-2-ol/eau + Tween® 80.
- Propylène carbonate/propan-2-ol/ eau éventuellement avec Tween® 80, éthanol ou NaCl.

5 L'acide acétique peut être employé comme solvant du polymère et donner lieu à la formation de coacervat et de microsphères bien individualisées, à condition d'utiliser l'eau comme durcisseur. Effectivement, il se forme des gouttelettes de coacervat dans l'association, 10 acide acétique/propan-2-ol mais en présence de méthyléthylcétone ou propane-1,2-diol comme durcisseurs, les gouttelettes de coacervat ne conservent pas leur forme sphérique et il se forme des amas de polymères.

15 L'association acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + Tween® 80 donne de bons résultats ainsi que l'association N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + Tween® 80. Cette étude a été complétée par la recherche de durcisseurs. Le propane-1,2-diol et le propan-2-ol s'avèrent être de bons candidats. Cependant, on peut noter une capacité d'extraction du solvant 20 moindre avec le propane-1,2-diol qu'en présence de propan-2-ol.

25 Le propylène carbonate est un solvant intéressant par sa faible toxicité mais aussi par sa solubilité partielle dans l'eau. L'association propylène carbonate/propan-2-ol permet de s'affranchir de l'eau grâce à la possibilité de remplacer la phase externe par un solvant ou du moins, limiter la diffusion du principe actif, par ajout d'un électrolyte dans la phase 25 externe ou par mélange d'eau et d'un solvant.

#### **b) Essais de coacervation avec le PLAGA 75 : 25 (Resomer® RG 756)**

30 Les solvants dans lesquels le PLAGA 75 : 25 est soluble sont l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétonitrile, l'acide acétique, le

diméthylacétamide, le diméthylformamide, l'éther diéthylique, la méthyléthylcétone, et la N-méthylpyrrolidone.

Le PLAGA 75 : 25 est insoluble dans le toluène, le propan-2-ol, le glycérol, le propane-1,2-diol, le propylène carbonate, le dioctyladipate et le triéthylcitrate.

Les deux solvants donnant les meilleurs résultats sont l'acide acétique et l'acétate d'éthyle. Les études se sont donc focalisées sur l'évaluation des associations acide acétique/glycérol et acide acétique/propane-1,2-diol ainsi que les couples acétate d'éthyle/propan-2-ol et acétate d'éthyle/propane-1,2-diol.

Les associations pour lesquelles on observe la formation de microsphères individualisées sont :

- acétate d'éthyle/propane-1,2-diol/eau + Tween® 80 ou propan-2-ol,
- acide acétique/glycérol ou propane-1,2-diol/eau + Tween® 80.

15

**c) Essais de coacervation avec le PLAGA 85 : 15 (Resomer® RG 858)**

Les solvants dans lesquels le PLAGA 85 : 15 est soluble sont l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétonitrile, l'acide acétique, la diméthylformamide, l'éthanolamine, l'éthylènediamine, la méthyléthylcétone, la N-méthylpyrrolidone, le toluène et le triéthylcitrate. Le PLAGA 85 : 15 est insoluble dans le propan-2-ol, le glycérol, le propane-1,2-diol, le dioctyladipate et le xylène.

Les associations pour lesquelles on observe la formation de coacervat et de microsphères sont :

- acétate d'éthyle/propan-2-ol ou propane-1,2-diol/eau + Tween® 80,
- acétate d'éthyle/propan-2-ol/propane-1,2-diol,
- acétate d'éthyle/propane-1,2-diol/propan-2-ol,
- acide acétique/glycérol (eau + Tween® 80) ou propane-1,2-diol ou propan-2-ol,

30

- acide acétique ou méthyléthylcétone/propane-1,2-diol/eau + Tween® 80,
- acide acétique/propan-2-ol/propane-1,2-diol,
- N-méthylpyrrolidone ou méthyléthylcétone/propan-2-ol/eau + Tween® 80,
- méthyléthylcétone/propane-1,2-diol/propan-2-ol.

**Exemple 2 : Réalisation de microsphères non chargées en principe actif en faisant varier les paramètres de la coacervation.**

Dans un premier temps les conditions opératoires sont établies pour la préparation de microsphères sans principe actif, afin de réaliser des particules de la taille désirée. L'influence de différents facteurs comme le volume d'agent de coacervation ajouté, le volume de durcisseur, le type et la vitesse d'agitation, et la méthode de collecte des microsphères est étudiée.

Le polymère est dissous dans 50 ml de solvant organique (Bécher n° 1) pour donner une solution à 4 % (p/v). La concentration en polymère est portée à 4 % (p/v) quand le solvant est la N-méthylpyrrolidone. Sous agitation, on ajoute l'agent de coacervation jusqu'à l'obtention d'un coacervat stable et visible. Puis le mélange est versé dans une solution de durcisseur additionnée d'un tensioactif (Bécher n° 2), sous agitation. Les microsphères sont ensuite récupérées par filtration. Les associations testées sont celles sélectionnées dans l'exemple 1.

**a) avec le PLAGA 50 : 50 (Resomer® RG 502):**

Les différents protocoles correspondant à chacune des associations retenues sont récapitulés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Modes opératoires définis pour les formulations de microsphères non chargées en principe actif à base de PLAGA 50 : 50								
Associations Solvant/non-solvant (avec eau + tensioactif comme durcisseur)	Volume de non-solvant	Agitation Bécher 1	Vitesse Bécher 1	Agitation Bécher 2	Vitesse Bécher 2	Volume de durcisseur	Méthode de filtration	Taille des micro- sphères
Acétate d'éthyle/ propan-2-ol	9 ml	Magnétique	500 t/min	magnétique	700 t/min	750 ml	Filtre plissé	40 µm
Acide acétique/ Propane-1,2-diol	16 ml	Ultrasons		magnétique	1100 t/min	250 ml	Filtre plissé	24 µm
Acide acétique/ propan-2-ol	16 ml	Ultrasons		magnétique	1400 t/min	250 ml	Filtre plissé	67 µm
N-méthylpyrrolidone/ Ethanol	31 ml	Mécanique	200 t/min	magnétique	1000 t/min	1000 ml	Centrifugation	31 µm
N-méthylpyrrolidone/ propan-2-ol	40 ml	Magnétique	300 t/min	magnétique	1000 t/min	500 ml	Filtre plissé	70 µm

# b) Application au PLAGA 75 : 25 (Resomer RG 756).

Des microsphères sont obtenues dans les conditions décrites dans le tableau 2 avec l'acétate d'éthyle comme solvant. Apparaissent trois possibilités d'agitation pour l'association acétate d'éthyle/propane-1,2-diol/eau + Montanox® 80 ou Tween® 80 : l'agitation par les ultrasons, l'agitation mécanique à pales et l'agitation magnétique. Il n'y a pas de différences notables dans la morphologie ou la taille des microsphères qui puissent justifier le choix de l'une de ces méthodes.

TABLEAU 2

Modes opératoires définis pour les formulations de microsphères non chargées en principe actif à base de PLAGA 75 : 25								
Associations Solvant/non-solvant (avec eau + tensioactif comme durcisseur)	Volume de non-solvant	Agitation Bécher 1	Vitesse bécher 1	Agitation Bécher 2	Vitesse Bécher 2	Volume de durcisseur	Méthode de filtration	Taille des micro- sphères
Acétate d'éthyle/ Propane-1,2-diol	15 ml	ultrasons		magnétique	1100 t/min	750 ml	Filtre plissé	20 µm
Acétate d'éthyle/ Propane-1,2-diol	15 ml	mécanique	400 t/min	magnétique	1100 t/min	750 ml	Filtre plissé	25 µm
Acétate d'éthyle/ propan-2-ol	16 ml	magnétique	900 t/min	magnétique	1100 t/min	800 ml	Filtre plissé	32 µm

**Exemple 3 : Réalisation de microsphères chargées en 5-fluorouracile (5-FU) comme principe actif.**

Les essais sont réalisés avec les associations de l'exemple 1 a) et  
5 b) qui ont conduit à l'observation d'un coacervat.

**a) Influence du principe actif sur la coacervation.**

Le principe actif à faible concentration (5 % en poids) forme avec la  
10 solution de polymère une dispersion homogène. La stabilité de la  
dispersion dépend des solvants ; ainsi la N-méthylpyrrolidone, qui est un  
solvant visqueux, conduit à une meilleure stabilité de la dispersion et les  
pertes en antimitotique par décantation ou adsorption sur les parois des  
bêchers sont diminuées.

15 L'emploi de propane-1,2-diol comme agent de coacervation  
stabilise davantage le système en augmentant la viscosité du milieu.

**b) Rendement de production.**

20 Il varie de 15 à 100 % suivant les associations. Les associations  
utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant du polymère donnent les  
meilleurs rendements, proches de 100 %.

**c) Taux et rendement d'encapsulation.**

25

Lorsque l'on augmente les charges théoriques en principe actif, le  
rendement d'encapsulation est très faible.

Un passage aux ultrasons permet d'individualiser les particules de  
principe actif. Lorsque l'on travaille avec de faibles concentrations, la  
30 dispersion est homogène et on atteint des rendements d'encapsulation de  
70 %.

**Exemple 4 : Etude de l'association N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + tensioactif.**

- 5        Parmi les polymères testés solubles dans la N-méthylpyrrolidone, on retiendra :
- Résomer® RG 502 (Boehringer Ingelheim), qui est un D,L-PLAGA 50 : 50,
  - Résomer® RG 756 (Boehringer Ingelheim) et Phusiline (Saint-Ismier)
- 10       qui sont des D,L-PLAGA 75 : 25,

La formulation initiale des microparticules utilise une solution organique de polymère à 4 ou 10 % (p/v) pour un volume de solvant de 5 ml. La coacervation est réalisée sous agitation magnétique. Le non-solvant du polymère est ajouté à l'aide d'une micropipette, ml par ml. Dès

15 l'apparition d'un trouble de la solution, un échantillon est prélevé et observé en microscopie optique. Une minute après l'apparition du trouble, le milieu de coacervation est versé goutte à goutte dans 200 ml de durcisseur (eau + Tween® 80 ou PVA). Le durcissement des microparticules est réalisé sous agitation mécanique. Une nouvelle

20 observation en microscopie optique des microparticules est effectuée pendant le durcissement. Puis les microparticules sont filtrées sous vide, ou à pression atmosphérique sur papier filtre en cas d'impossibilité de filtration sous vide (colmatage quasi-immédiat du filtre ou durée de filtration trop importante). Enfin, les microparticules sont observées juste

25 après filtration et après lyophilisation.

Les microparticules obtenues avec l'association NMP/éthanol/eau + tensioactif sont, en microscopie optique, sphériques, lisses et régulières, quel que soit le stade de la formulation et quel que soit le type de polymère.

30       Pour tous les lots réalisés, la filtration après durcissement a été réalisée sur papier filtre et à pression atmosphérique. La taille des



microparticules est comprise entre 30 et 50  $\mu\text{m}$ . De nombreuses microparticules d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre sont aussi observées.

- **Influence du type de polymère et de sa concentration.**

Les microparticules obtenues présentent toutes le même aspect en microscopie optique.

Les meilleurs rendements sont obtenus avec Resomer® RG 502 et Resomer® RG 756 dans les conditions suivantes (tableau 3).

TABLEAU 3

Type de polymère	Concentration du polymère (p/v)	Type de durcisseur	Concentration du tensioactif dans le durcisseur (v/v)	Temps de durcissement	Température pendant la coacervation	Température pendant le durcissement	Rendement de fabrication
RG 502	10 %	PVA	0,5 %	3 h 30	ambiante	ambiante	23,8 %
RG 502	10 %	Tween® 80	1 %	3 h 30	ambiante	≤ 4°C	35,9 %
RG 756	4 %	Tween® 80	1 %	2 h	ambiante	ambiante	49,0 %
RG 756	4 %	Tween® 80	5 %	2 h	ambiante	ambiante	38,6 %

- **Influence de la nature du durcisseur et du temps de durcissement.**

Le type de durcisseur (eau, eau + Tween® 80, ou eau + PVA), pour le même polymère PLAGA 50 : 50 (RG 502) et à température ambiante, n'influe ni sur la filtration ni sur le rendement de fabrication des microparticules qui reste compris entre 17,5 et 23,8 %.

Le temps de durcissement, pour le même polymère PLAGA 50 : 50 (RG 502), permet d'augmenter le rendement de fabrication d'environ 10 %, à température ambiante.

- **Influence de la température**

- a) Pendant le durcissement

Un durcissement à une température inférieure à 4°C a permis de doubler le rendement de fabrication des microparticules, pour le PLAGA 50 : 50 (RG 502) : 35,9 contre 17,5 %.

- b) Pendant la coacervation

Les manipulations réalisées entièrement à une température inférieure à 4°C ont un rendement de fabrication de 10,5 % maximum.

L'association N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + tensioactif conduit à la formation de microparticules présentant un aspect satisfaisant en microscopie optique.

**Exemple 5 : Microsphères chargées avec la progestérone ou le budésônide.**

La progestérone et le budésônide sont des principes actifs hydrophobes solubles dans l'acétate d'éthyle.

On utilise l'association acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + Tween® 80, et le D,L-PLAGA 75 : 25 (Phusis, Saint-Ismier) comme polymère.

Les rendements de fabrication sont tous supérieurs à 90 %.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4.

10

Formulation		Fabrication		Caractéristiques	
1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42
43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66
67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78
79	80	81	82	83	84
85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96
97	98	99	100	101	102
103	104	105	106	107	108
109	110	111	112	113	114
115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126
127	128	129	130	131	132
133	134	135	136	137	138
139	140	141	142	143	144
145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156
157	158	159	160	161	162
163	164	165	166	167	168
169	170	171	172	173	174
175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186
187	188	189	190	191	192
193	194	195	196	197	198
199	200	201	202	203	204
205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216
217	218	219	220	221	222
223	224	225	226	227	228
229	230	231	232	233	234
235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246
247	248	249	250	251	252
253	254	255	256	257	258
259	260	261	262	263	264
265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276
277	278	279	280	281	282
283	284	285	286	287	288
289	290	291	292	293	294
295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306
307	308	309	310	311	312
313	314	315	316	317	318
319	320	321	322	323	324
325	326	327	328	329	330
331	332	333	334	335	336
337	338	339	340	341	342
343	344	345	346	347	348
349	350	351	352	353	354
355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366
367	368	369	370	371	372
373	374	375	376	377	378
379	380	381	382	383	384
385	386	387	388	389	390
391	392	393	394	395	396
397	398	399	400	401	402
403	404	405	406	407	408
409	410	411	412	413	414
415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426
427	428	429	430	431	432
433	434	435	436	437	438
439	440	441	442	443	444
445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456
457	458	459	460	461	462
463	464	465	466	467	468
469	470	471	472	473	474
475	476	477	478	479	480
481	482	483	484	485	486
487	488	489	490	491	492
493	494	495	496	497	498
499	500	501	502	503	504
505	506	507	508	509	510
511	512	513	514	515	516
517	518	519	520	521	522
523	524	525	526	527	528
529	530	531	532	533	534
535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546
547	548	549	550	551	552
553	554	555	556	557	558
559	560	561	562	563	564
565	566	567	568	569	570
571	572	573	574	575	576
577	578	579	580	581	582
583	584	585	586	587	588
589	590	591	592	593	594
595	596	597	598	599	600
601	602	603	604	605	606
607	608	609	610	611	612
613	614	615	616	617	618
619	620	621	622	623	624
625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636
637	638	639	640	641	642
643	644	645	646	647	648
649	650	651	652	653	654
655	656	657	658	659	660
661	662	663	664	665	666
667	668	669	670	671	672
673	674	675	676	677	678
679	680	681	682	683	684
685	686	687	688	689	690
691	692	693	694	695	696
697	698	699	700	701	702
703	704	705	706	707	708
709	710	711	712	713	714
715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726
727	728	729	730	731	732
733	734	735	736	737	738
739	740	741	742	743	744
745	746	747	748	749	750
751	752	753	754	755	756
757	758	759	760	761	762
763	764	765	766	767	768
769	770	771	772	773	774
775	776	777	778	779	780
781	782	783	784	785	786
787	788	789	790	791	792
793	794	795	796	797	798
799	800	801	802	803	804
805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816
817	818	819	820	821	822
823	824	825	826	827	828
829	830	831	832	833	834
835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846
847	848	849	850	851	852
853	854	855	856	857	858
859	860	861	862	863	864
865	866	867	868	869	870
871	872	873	874	875	876
877	878	879	880	881	882
883	884	885	886	887	888
889	890	891	892	893	894
895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906
907	908	909	910	911	912
913	914	915	916	917	918
919	920	921	922	923	924
925	926	927	928	929	930
931	932	933	934	935	936
937	938	939	940	941	942
943	944	945	946	947	948
949	950	951	952	953	954
955	956	957	958	959	960
961	962	963	964	965	966
967	968	969	970	971	972
973	974	975	976	977	978
979	980	981	982	983	984
985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996
997	998	999	1000	1001	1002
1003	1004	1005	1006	1007	1008
1009	1010	1011	1012	1013	1014
1015	1016	1017	1018	1019	1020
1021	1022	1023	1024	1025	1026
1027	1028	1029	1030	1031	1032
1033	1034	1035	1036	1037	1038
1039	1040	1041	1042	1043	1044
1045	1046	1047	1048	1049	1050
1051	1052	1053	1054	1055	1056
1057	1058	1059	1060	1061	1062
1063	1064	1065	1066	1067	1068
1069	1070	1071	1072	1073	1074
1075	1076	1077	1078	1079	1080
1081	1082	1083	1084	1085	1086
1087	1088	1089	1090	1091	1092
1093	1094	1095	1096	1097	1098
1099	1100	1101	1102	1103	1104
1105	1106	1107	1108	1109	1110
1111	1112	1113	1114	1115	1116
1117	1118	1119	1120	1121	1122
1123	1124	1125	1126	1127	1128
1129	1130	1131	1132	1133	1134
1135	1136	1137	1138	1139	1140
1141	1142	1143	1144	1145	1146
1147	1148	1149	1150	1151	1152
1153	1154	1155	1156	1157	1158
1159	1160	1161	1162	1163	1164
1165	1166	1167	1168	1169	1170
1171	1172	1173	1174	1175	1176
1177	1178	1179	1180	1181	1182
1183	1184	1185	1186	1187	1188
1189	1190	1191	1192	1193	1194
1195	1196	1197	1198	1199	1200
1201	1202	1203	1204	1205	1206
1207	1208	1209	1210	1211	1212
1213	1214	1215	1216	1217	1218
1219	1220	1221	1222	1223	1224
1225	1226	1227	1228	1229	1230
1231	1232	1233	1234	1235	1236
1237	1238	1239	1240	1241	1242
1243	1244	1245	1246	1247	1248
1249	1250	1251	1252	1253	1254
1255	1256	1257	1258	1259	1260
1261	1262	1263	1264	1265	1266
1267	1268	1269			

TABLEAU 4

Lot	Conc. polymère (p/v) et masse PA	Coacervation			Durcisseur						Rende- ment de fabrica- tion	Granulo- métrie ( $\mu$ m)
		Mode d'ajout du non- solvant	Tempé- rature	Agita- tion	Type	Conc. TA	Volume	Tempé- rature	Durée	Agita- tion		
1	4 % progestérone 28,5 mg (solution)	200/200 $\mu$ l 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	96,7 %	28,0 $\pm$ 12,5
2	4 % progestérone 30,1 mg (solution)	200/200 $\mu$ l 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	>99,9%	25,3 $\pm$ 9,2
3	4 % budésotide 30,8 mg (solution)	200/200 $\mu$ l 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	>99,9%	20,8 $\pm$ 8,7
4	4 % budésotide 29,8 mg (solution)	200/200 $\mu$ l 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	97,6 %	22,5 $\pm$ 9,4

\* filtration sous vide, filtre Nylon.

Les taux et rendements d'encapsulation des principes actifs figurent dans le tableau suivant et sont calculés comme suit :

-  $T_{théo.} = [\text{poids de principe actif} / (\text{poids de polymère} + \text{poids de principe actif})] \times 100$ ,

5 -  $T_{exp.} = [\text{poids de principe actif} / \text{poids de microparticules sèches}] \times 100$ ,

Ils permettent de calculer le rendement d'encapsulation R :

-  $R = [T_{exp.} / T_{théo.}] \times 100$

Taux et rendements d'encapsulation de la progestérone et du budésonide avec le PLAGA 75 : 25 (Phusis)				
Lot	Taux Théorique	Taux expérimental	Rendement d'encapsulation	Taux d'humidité résiduelle
1 (progestérone)	12,4 %	8,2 %	66,1 %	11,9 %
2 (progestérone)	13,1 %	9,5 %	72,5 %	—
3 (budésonide)	13,3 %	8,0 %	60,1 %	—
4 (budésonide)	13,0 %	8,8 %	67,7 %	16,4 %

- 10 L'association acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + tensioactif conduit à la formation de microparticules présentant un aspect satisfaisant en microscopie optique. En revanche, les microparticules obtenues avec ce couple solvant/non-solvant sont plus fragiles et sont séchées à l'air libre, donc à température ambiante et à pression atmosphérique, pour ne pas
- 15 être agglomérées de façon irréversible. Les rendements de fabrication sont proches de 100 %. L'agrégation est le principal problème rencontré avec cette association solvant/non-solvant/durcisseur. Elle peut être réduite en jouant sur différents paramètres de la formulation. La
- température à laquelle est effectuée la coacervation est notamment un
- 20 facteur essentiel : abaissée à  $-4^{\circ}\text{C}$ , elle permet de figer le polymère et de rigidifier les microparticules qui, ainsi, s'individualisent et ne se collent plus entre elles.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation qui consiste en
- la désolvatation ménagée ou coacervation d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant ledit principe actif, ladite coacervation étant induite par addition d'un non-solvant et se traduisant par le dépôt
  - 10 du polymère à la surface du principe actif, puis
  - le durcissement du dépôt de polymère par ajout d'un agent durcisseur, ledit durcissement se traduisant par la formation d'un film continu enrobant le principe actif,
  - caractérisé en ce que
  - 15 - le solvant du polymère est un solvant organique non chloré de point d'ébullition compris entre 30°C et 240 °C et de permittivité diélectrique relative et comprise entre 4 et 60, avantageusement choisi parmi l'acétate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone, la méthyléthylcétone, l'acide acétique, le propylène carbonate et leurs mélanges,
  - 20 - le non-solvant est un alcool ou une cétone comprenant 2 à 5 atomes, et préférentiellement 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier l'éthanol ( $\epsilon=24$ ), le propan-2-ol ( $\epsilon=18$ ), le propane-1,2-diol ( $\epsilon$  entre 18 et 24) et le glycérol ( $\epsilon=40$ ), ou la méthyléthylcétone ( $\epsilon=18$ ),
  - l'agent durcisseur est choisi parmi l'eau, les alcools comprenant 1 à 4
  - 25 atomes de carbone à condition que l'agent durcisseur soit un alcool différent du non-solvant, et leurs mélanges.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le non-solvant et le durcisseur sont respectivement choisis parmi les couples suivants : propane-1,2-diol et propan-2-ol, glycérol et propane-1,2-diol, glycérol et propan-2-ol, propan-2-ol et propane-1,2-diol.
- 5 3. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le polymère est un polymère biodégradable dont la masse moléculaire en poids (Mw) est comprise entre 10 000 et 90 000 g/mole, de préférence entre 15 000 et 50 000 g/mole, dont l'indice de polydispersité (Ip) est  
10 compris entre 1 et 3,5, de préférence entre 1,5 et 2,5.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le polymère est un polymère d'acide lactique (PLA) ou un polymère d'acides lactique et glycolique (PLAGA).
- 15 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le polymère est un PLAGA tel que Mw est comprise entre 15 000 et 25 000, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6, et le pourcentage d'acide glycolique est inférieur à 30%, de  
20 préférence égal à 25%.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la concentration en polymère dans le solvant est comprise entre 1 et 10% (p/v), de préférence de l'ordre de 4% (p/v).
- 25 7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le rapport volumique non-solvant/solvant est compris entre 1/2 et 1/1.
- 30 8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température de coacervation est inférieure à la température de



transition vitreuse du polymère, de préférence inférieure ou inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore égale à -4°C.

- 5 9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent durcisseur contient en outre un agent tensioactif, la concentration dudit agent tensioactif dans l'agent durcisseur étant comprise entre 0,1 et 10% (v/v).
- 10 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent tensioactif est un ester de sorbitane, par exemple le Tween 80, ou l'alcool polyvinylique.
11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce  
15 que le rapport volumique agent durcisseur/solvant est compris entre 5/1 et 180/1, et de préférence entre 15/1 et 120/1.
12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce  
20 que le durcissement des microsphères est réalisé sous agitation à une vitesse comprise entre 500 et 1500 t/min.
13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température de durcissement est inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure ou égale à  
25 0,5°C.
14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lorsque le principe actif forme une dispersion dans la solution de polymère, le solvant et le non-solvant ont une viscosité suffisamment  
30 élevée pour stabiliser le principe actif.

15. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le principe actif est dispersé sous ultra-sons pour former une dispersion dans la solution de polymère, et la coacervation est réalisée sous agitation douce, de préférence de type magnétique ou mécanique.
16. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la granulométrie du principe actif est comprise entre 1 et 50 micromètres, et préférentiellement entre 5  $\mu$ m et 30  $\mu$ m.
17. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant est la N-méthylpyrrolidone, le non-solvant est l'éthanol, et le durcisseur est l'eau.
18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le solvant est l'acétate d'éthyle.
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le solvant est l'acétate d'éthyle, le non-solvant est le propan-2-ol, et le durcisseur est l'eau.
20. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que le polymère est un PLAGA 75 : 25 tel que Mw est comprise entre 15 000 et 20 000, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6.
21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le solvant est l'acide acétique, le durcisseur est l'eau, et le polymère est un PLAGA 50 : 50.

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 578200  
FR 9910854

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	THOMASIN C ET AL: "DRUG MICROENCAPSULATION BY PLA/PLGA COACERVATION IN THE LIGHT OF THERMODYNAMICS. 1. OVERVIEW AND THEORETICAL CONSIDERATIONS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, US, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, WASHINGTON, vol. 87, no. 3, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 259-268, XP000736341 ISSN: 0022-3549 * tableau 1 *	1
A	WO 97 41837 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV; ALKERMES INC (US)) 13 novembre 1997 (1997-11-13) * exemple 1 *	1
A	WO 95 13799 A (MEDISORB TECHNOLOGIES INTERNAT) 26 mai 1995 (1995-05-26) * page 9, ligne 14 - page 11, ligne 12 *	1
A	EP 0 330 180 A (BIOMATERIALS UNIVERSE INC) 30 août 1989 (1989-08-30) * revendications 5-9 *	1
A	US 5 324 520 A (DUNN RICHARD L ET AL) 28 juin 1994 (1994-06-28) * exemple 1 *	1
		<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 7)</b>
		B01J A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 mai 2000		Shade, M
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1 (mars 1995) (modifié)

1201  
1202

1203  
1204  
1205

1206  
1207  
1208

1209  
1210

1211  
1212

1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1220  
1221  
1222  
1223  
1224  
1225  
1226  
1227  
1228  
1229  
1230  
1231  
1232  
1233  
1234  
1235  
1236  
1237  
1238  
1239  
1240  
1241  
1242  
1243  
1244  
1245  
1246  
1247  
1248  
1249  
1250  
1251  
1252  
1253  
1254  
1255  
1256  
1257  
1258  
1259  
1260  
1261  
1262  
1263  
1264  
1265  
1266  
1267  
1268  
1269  
1270  
1271  
1272  
1273  
1274  
1275  
1276  
1277  
1278  
1279  
1280  
1281  
1282  
1283  
1284  
1285  
1286  
1287  
1288  
1289  
1290  
1291  
1292  
1293  
1294  
1295  
1296  
1297  
1298  
1299  
1300